

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktoren: Prof.Dr. H.J. Dengler und Prof.Dr. H.G. Lasch

**Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der metachromatischen
Reaktion saurer Glycosaminoglycane durch Proteine und
Enzyme.**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Justus Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

KLAUS HABERKORN

aus Frankfurt/Main

Gießen 1970

Aus den Medizinischen Kliniken und Polikliniken
der Justus Liebig-Universität Gießen
Direktoren: Prof.Dr. H.J. Dengler und Prof.Dr. H.G. Lasch

**Untersuchungen zur Beeinflussbarkeit der metachromatischen
Reaktion saurer Glycosaminoglycane durch Proteine und
Enzyme.**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät der
Justus Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

KLAUS HABERKORN

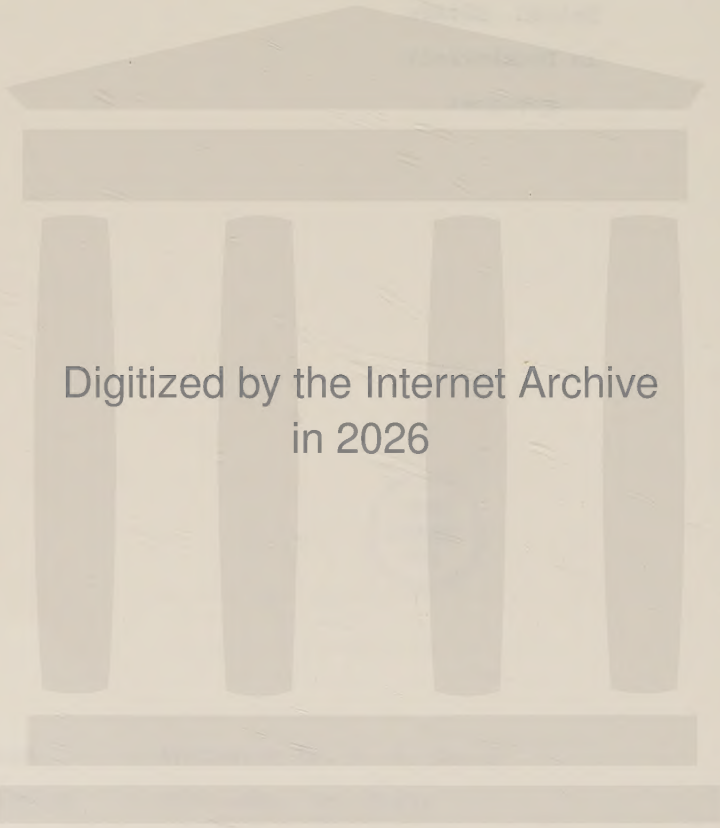
aus Frankfurt/Main

Gießen 1970



Dekan : Professor Dr. H. G. Lasch
Referent : Priv.-Doz. Dr. Platt
Korreferent : Professor Dr. Kracht

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545905_0026

Gliederung:

1.0.0 Einleitung

2.0.0 Material

- 1.0 Farbstoff
- 2.0 Mucopolysaccharide
- 3.0 Enzyme
- 4.0 Proteine

3.0.0 Methodik

- 1.0 Spektralphotometrische Untersuchung der Farbstofflösung
- 2.0 Änderungen der Mucopolysaccharidkonzentration bei gleicher Farbstoffkonzentration
- 3.0 Änderungen der Proteinkonzentration bei gleicher Farbstoff- und Mucopolysaccharidkonzentration
- 4.0 Farbreaktion nach enzymatischem Abbau der Mucopolysaccharide.

4.0.0 Ergebnisse

- 1.0 Absorptionsmessungen von Toluidinblaulösungen - in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration
- 2.0 Absorptionsmessungen metachromatischer Farblösungen - in Abhängigkeit von der Mucopolysaccharidkonzentration
 - 1. Heparin
 - 2. Hyaluronsäure
- 3.0 Einfluß von Proteinlösungen auf die metachromatische Reaktion
 - 1. Albumin
 - 2. Lab-Trol
 - 3. Gelatine
 - 4. Myoglobin
 - 5. Hämoglobin
 - 6. α -Globulin
 - 7. Protaminsulfat

4.0 Einfluß von Enzymen auf die metachromatische Reaktion

1. Hyaluronidase - Kinetin, Luronase, Thiomucase
2. Collagenase

5.0.0 Diskussion

6.0.0 Zusammenfassung

7.0.0 Literatur

0 Einleitung

Der von Ehrlich (1) geprägte Begriff der " Metachromasie " umfaßt die Erscheinung, daß beim Anfärben bestimmter Gewebselemente eine deutlich wahrnehmbare Änderung des Absorptionsspektrums von zahlreichen Farben auftritt (2).

Unabhängig voneinander wurde dieser histochemische Befund von Cornil (3), Heschl (4) und Jürgens (5) im Jahre 1875 gefunden. Die Tatsache, daß viele der Farben, die zu histologischen Färbereaktionen benutzt wurden, Mischungen verschiedener Farbstoffe waren (6), führte ebenso zu gegensätzlichen Auffassungen wie die Beobachtung, daß selbst bei Verwendung reiner Farben die normale Farbe durch Konzentrationsunterschiede verändert sein konnte (7), (8), (9).

Aus neueren Untersuchungen geht hervor (10), (11), (2), daß die metachromatische Erscheinung durch verschiedene Faktoren bedingt sein kann:

So sehen Scheibe und Zanker (2) das Auftreten der metachromatischen Reaktion einmal in der Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle untereinander, zum anderen durch Wechselwirkung der Farbstoffmoleküle mit der Umgebung bedingt.

Die Stärke der metachromatischen Erscheinung hängt ab von der Zahl der Farbstoffmoleküle auf der Trägersubstanz (z.B. Mucopolysaccharide), von der Intensität der Wechselwirkung zwischen beiden Komponenten und dem Polymerisationsgrad der Trägersubstanz.

Dieser metachromatische Effekt ist am Heparin, dem am stärksten chromotropen Stoff tierischen Ursprungs (6), besonders deutlich nachweisbar, da das Heparinmolekül stark ionisierte $(-)\text{SO}_3\text{H}$ -Gruppen besitzt und die gebundenen Farbstoffmoleküle infolge des geringen Abstandes von $3 - 5 \text{ \AA}$ der anionischen Gruppen miteinander in Wechselwirkung treten (12), (13).

In histochemischen Untersuchungen an normalen und arteriosklerotisch veränderten Aorten konnte gezeigt werden, daß in zahlreichen Abschnitten atheromatös veränderter Gefäßwandbezirke mit gesteigerten Mucopolysaccharid-Ablagerungen nach Toluidinblaufärbungen keine Metachromasie auftrat (14).

Aktivitätsmessungen, der am Abbau der Mucopolysaccharide beteiligten Enzyme: Hyaluronidase, β -Glucuronidase und β -Acetylglucosaminidase in normalen und arteriosklerotisch veränderten Aortenbezirken zeigten einen signifikanten Enzymaktivitätsanstieg in arteriosklerotisch umgewandelten Gefäßwandbezirken(15)

In der vorliegenden Arbeit sollte nun mit Hilfe spektralphotometrischer Messungen der Frage nachgegangen werden, inwieweit

1. Änderungen des Polymerisationsgrades der Mucopolysaccharide - durch enzymatischen Abbau
2. Störungen der Wechselwirkungen zwischen Mucopolysacchariden und Toluidinblau - durch Aminosäuren und Proteine

zu einer Beeinflussung der metachromatischen Farbreaktion führen.

2.0.0 Material

2.1.0 Farbstoff

Als Farbstoff wurde der Thiazinfarbstoff Toluidinblau 0 nach Hoyer (Merck AG., Darmstadt) verwendet.

Die Strukturformel ist in Abb. 1 dargestellt

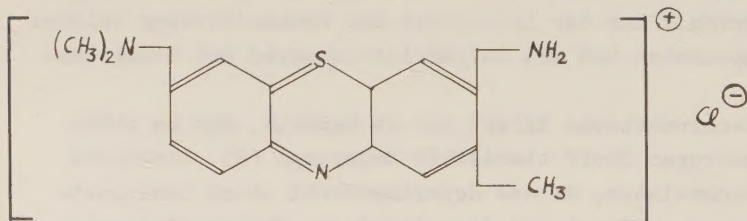


Abb. 1: Toluidinblau C₁₅ H₁₆ Cl N₃S
3-Amino-7-dimethylamino- 2-methyl-
phenazothioniumchlorid.

Der Farbstoffgehalt beträgt 50 - 60%. Der Farbstoff liegt als Zinkchlorid-Doppelsalz vor.

2.2.0 Mucopolysaccharide

Heparin⁺ wurde in Konzentrationen von 100 µg/ml - 1 mg/ml eingesetzt.

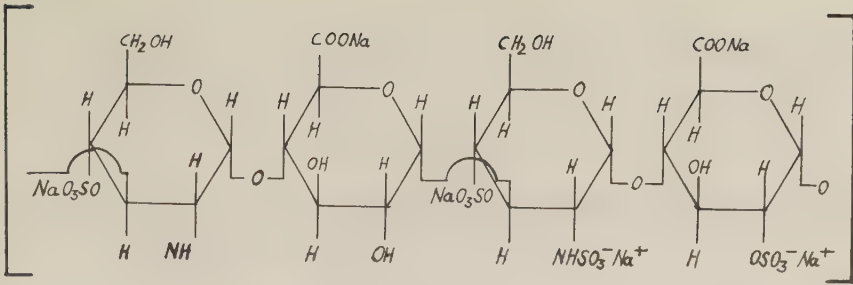


Abb. 2: Heparin (13)

Hyaluronsäure (Kaliumhyaluronat) wurde nach Buddecke (16), (17) aus Hahnenkämmen gewonnen.

Das Substrat wurde in Konzentrationen von 100 µg/ml - 2 mg/ml verwendet.

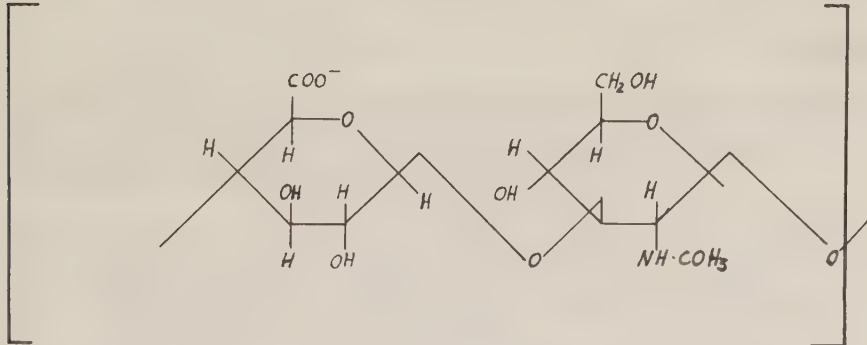


Abb. 3: Hyaluronsäure (18)

Enzyme

Als Enzyme dienten Thiomucase ⁺⁺, Luronase ⁺⁺⁺, Kinetin ⁺⁺⁺⁺ und Collagenase ⁺⁺⁺⁺⁺

- + Fa. La Roche, Basel
- ++ Chemipharm, Saarbrücken
- +++ Bayer, Elberfeld
- ++++ Schering AG., Berlin
- +++++ Serva, Heidelberg.

2.4.0 Proteine

Um den Einfluß der Proteine auf die metachromatische Reaktion zu erfassen, wurden Eiweißkörper verschiedenen Molekulargewichtes eingesetzt:

Rinder-Albumin (Behringwerke AG., Marburg)	
Lab-Trol - ein flüssiges Kontrollserum mit einem Gesamteiweißgehalt von 7 g/100 ml (Dade Reagents-Incorp., Miami)	
Gelatine	) Fa. Serva, Heidelberg
Myoglobin vom Pferd	
Hämoglobin vom Rind	
α -Globulin aus Rinderserum	
Protaminsulfat vom Lachs	

3.0.0 Methodik

3.1.0 Spektralphotometrische Untersuchung der Farbstofflösung.

Von wässrigen Toluidinblaulösungen in Konzentrationen von 0,5 - 17,5 $\mu\text{g/ml}$ wurden Absorptionsmessungen durchgeführt. Die Messungen erfolgten gegen Aqua dest.

Alle Extinktionsmessungen erfolgten im Spektralphotometer (Beckmann DB - G), die Aufzeichnung der Absorptionskurven wurde mit einem Zweikoordinatenschreiber durchgeführt (Beckmann Ten-Inch Potentiometric Recorder).

Die Aufzeichnung erfolgte für den Bereich der Wellenlänge von 700 $\text{m}\mu$ - 500 $\text{m}\mu$.

3.2.0 Änderungen der Mucopolysaccharidkonzentrationen bei gleicher Farbstoffkonzentration.

Toluidinblaulösungen der Konzentration 5, 10, 20, 25, 30 und 40 $\mu\text{g/ml}$ wurden mit Hyaluronsäure- und Heparin-Lösungen (100 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$) zusammengegeben.

Die Absorptionskurven wurden aufgezeichnet.

Die γ -Bande, die beim Auftreten metachromatischer Färbungen im kurzwelligen Bereich in Erscheinung tritt, wird als metachromatische Bande bezeichnet (19), während die α -Bande das Absorptionsmaximum des Farbstoffes in nicht zusammengelagerter Form darstellt.

Die β -Bande ist für die dimere Aggregation der Farbstoffteilchen repräsentativ, gehört nach Levine und Schubert(19

jedoch nicht zum metachromatischen Effekt.

Als Maß für die metachromatische Reaktion wurde nach Wiame (20) der Verhältniswert R der Absorptionen für die metachromatische Bande und die λ -Bande des nicht polymerisierten Farbstoffes angesprochen.

3.3.0 Änderungen der Proteinkonzentration bei gleicher Farbstoff- und Mucopolysaccharidkonzentration.

Zu Substratlösungen (Heparin, Hyaluronsäure) wurden Eiweißkörper in steigender Konzentration zugefügt. Nach Farbstoffzugabe wurde der Einfluß der Proteine auf die metachromatische Reaktion durch Absorptionsmessungen festgestellt. Die durch Zugabe der verschiedenen Eiweißkörper zu den Untersuchungslösungen bewirkten Trübungen wurden durch entsprechende Blindwerte korrigiert, wie auch die Eigenfarbe von Myoglobin und Hämoglobin durch entsprechende Blindwerte berichtigt wurden.

Unlösliche Komplexe wie sie nach Gelatinezugabe zu Heparin- und Hyaluronsäure-Lösungen auftraten, wurden durch Zentrifugieren aus den Lösungen entfernt.

3.4.0 Farbreaktion nach enzymatischem Abbau der Mucopolysaccharide

Die Enzym-Substratreaktionen erfolgten beim pH-Optimum der Hyaluronidase bzw. Collagenase.

Für Kinetin, Luronase und Thiomucase wurde 0,05 m Phosphat-Citrat-Puffer pH = 4,1, für Collagenase Calcium-Acetat Puffer pH = 7,2 verwendet.

Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Substrat-Enzymlösungen für 48^h bei 4°C gegen Aqua dest. dialysiert. Anschließend wurden 2 ml des Dialysates mit der gleichen Menge einer Toluidinblaulösung (25 µg/ml) zusammengegeben und die Absorption im Spektralphotometer gemessen.

Die Substratkonzentrationen betrugen für

Hyaluronsäure	500 µg/ml
Heparin	25 µg/ml
Gelatine	500 µg/ml,

die Enzymkonzentrationen für Kinetin, Luronase und Thiomucase jeweils 150 i.E. im Versuchsansatz, für Collagenase 75 E.U.

Die Proteinwirkung der Enzymzugabe wurde für Heparin und Hyaluronsäure durch Absorptionsmessungen der Substrat-Farbstofflösungen unmittelbar nach Enzymzugabe festgestellt.

4.0.0 Ergebnisse.

4.1.0 Absorptionsmessungen von Toluidinblaulösungen - in Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration

Für die verwendeten 1 cm Glasküvetten (Beckmann) ergibt sich für Toluidinblau O eine obere Grenzkonzentration von $15 \mu\text{g/ml} = 4,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol/l}$. Die Abbildung 4 zeigt für die blaue Lösung des Farbstoffes ein Absorptionsmaximum bei $635 - 640 \text{ m}\mu$.

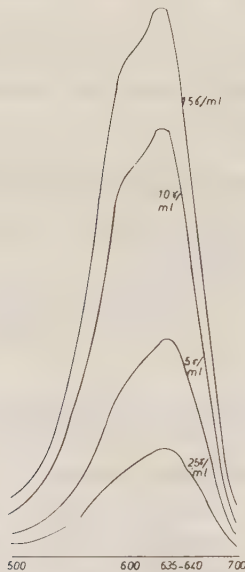


Abb. 4: Verlauf der Absorptionskurven für Toluidinblau-Konzentrationen von $2,5 \mu\text{g/ml}$ - $15 \mu\text{g/ml}$

In dem Diagramm der Abbildung 5 sind die Absorptionsänderungen in Abhängigkeit von der Toluidinblau-Konzentration im Bereich $0,5 \mu\text{g/ml}$ - $17,5 \mu\text{g/ml}$ aufgetragen. In diesem Bereich findet sich keine Abweichung von dem Beer'schen Gesetz.

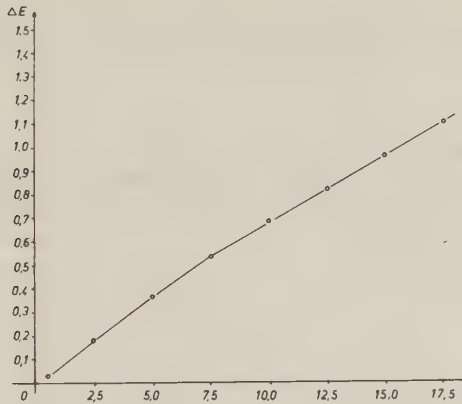


Abb. 5: Nachweis der Gültigkeit des Beer'schen Gesetzes für Toluidinblau-Konzentrationen von $0,5 \mu\text{g/ml}$ - $17,5 \mu\text{g/ml}$

4.2.0 Absorptionsmessungen metachromatischer Farblösungen in Abhängigkeit von der Mucopolysaccharid-Konzentration.

4.2.1 Heparin

Die metachromatische Reaktion von Heparin mit den Ausgangskonzentrationen $100 \mu\text{g/ml}$ und $1000 \mu\text{g/ml}$ wurde für Toluidinblau-Konzentrationen von $5 \mu\text{g/ml}$ - $40 \mu\text{g/ml}$ geprüft. Die Tabelle 1 zeigt die ermittelten Werte für die niedrigere Heparin-Konzentration, wobei die angegebenen Konzentrationen Endwerte darstellen:

Heparin ($\mu\text{g/ml}$)	Toluidinblau ($\mu\text{g/ml}$)	$R = \frac{E_{540}}{E_{635}}$	Kurve in Abb.6
50	2,5	1,875	1
50	5,0	2,185	2
50	10,0	3,225	3
50	12,5	2,730	4
50	15,0	2,725	5
50	20,0	2,660	6

Tab.1: Metachromatische Reaktion von Heparin (50 $\mu\text{g/ml}$) und Toluidinblau (2,5 $\mu\text{g/ml}$ - 20 $\mu\text{g/ml}$)

Für die höher konzentrierte Heparinlösung ergaben sich die Werte, die in Tabelle 2 dargestellt sind:

Heparin ($\mu\text{g/ml}$)	Toluidinblau ($\mu\text{g/ml}$)	$R = \frac{E_{540}}{E_{635}}$	Kurve in Abb.7
500	2,5	0,896	1
500	5,0	1,480	2
500	10,0	2,100	3
500	12,5	2,150	4
500	15,0	2,300	5
500	20,0	2,565	6

Tab. 2: Metachromatische Reaktion von Heparin (500 $\mu\text{g/ml}$) und Toluidinblau (2,5 $\mu\text{g/ml}$ - 20 $\mu\text{g/ml}$)

Die Abbildungen 6 und 7 zeigen den Verlauf der Absorptionen für die beiden Heparinlösungen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ und 500 $\mu\text{g/ml}$.

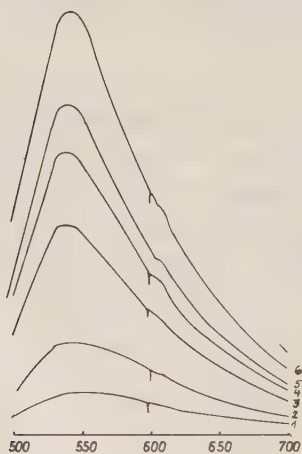


Abb. 6: Absorptionskurven
zu Tab. 1

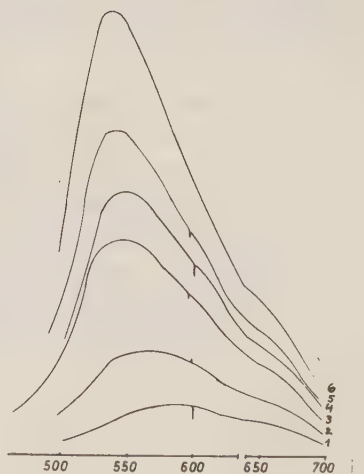


Abb.7 Absorptionskurven
zu Tab. 2

2.2 Hyaluronsäure

Für Hyaluronsäurelösungen mit 100 $\mu\text{g/ml}$ und 1000 $\mu\text{g/ml}$ Ausgangskonzentration ergeben sich die in Tabelle 3 und 4 angegebenen Werte:

Hyaluronsäure ($\mu\text{g/ml}$)	Toluidinblau ($\mu\text{g/ml}$)	$R = \frac{E_{555}}{E_{635}}$	Kurve in Abb. 8
50	2,5	0,406	1
50	5,0	0,812	2
50	10,0	1,014	3
50	12,5	0,822	4
50	15,0	0,791	5
50	20,0	0,760	6

Tab. 3: Metachromatische Reaktion von Hyaluronsäure (50 $\mu\text{g/ml}$) und Toluidinblau (2,5 $\mu\text{g/ml}$ - 20,0 $\mu\text{g/ml}$)

Aus den Kurven der Abb. 8 ist zu erkennen, daß mit zunehmender Konzentration des Farbstoffes - bei niedriger Substratkonzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ der Hyaluronsäure - die γ -Bande der metachromatischen Reaktion bei 555 $\text{m}\mu$ eine Erhöhung erfährt, wobei sie nach Erreichen eines Maximalwertes mit zunehmender Konzentration wieder absinkt.

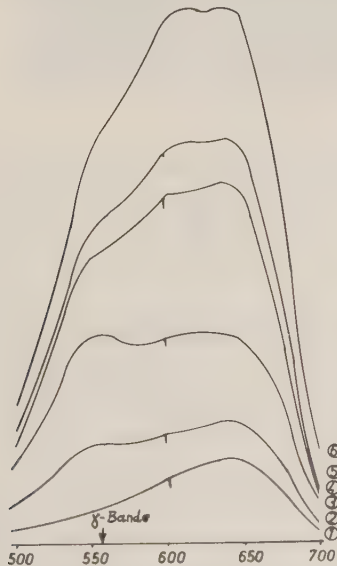


Abb. 8: Absorptionskurven zu Tab. 3

Hyaluronsäure ($\mu\text{g/ml}$)	Toluidinblau ($\mu\text{g/ml}$)	$R = \frac{E_{555}}{E_{635}}$	Kurve in Abb. 9
500	2,5	0,596	1
500	5,0	0,662	2
500	10,0	0,912	3
500	12,5	1,035	4
500	15,0	1,190	5
500	20,0	1,415	6

Tab. 4: Metachromatische Reaktion von Hyaluronsäure (500 $\mu\text{g/ml}$) und Toluidinblau (2,5 $\mu\text{g/ml}$ - 20,0 $\mu\text{g/ml}$)

Die Ergebnisse für die höher konzentrierte Hyaluronsäure lassen erkennen, daß sich mit zunehmender Farbstoff-Konzentration das Verhältnis der Absorptionswerte immer deutliche zugunsten der γ -Bande ändert.

Der Verlauf der Absorptionskurven in Abbildung 9 zeigt dies. Anstieg deutlich.



Abb. 9: Absorptionskurven zu Tab. 4

Abbildung 10 zeigt einen Vergleich der Metachromotropie von Heparin (Röhrchen 2) und Hyaluronsäure (Röhrchen 1) bei einer Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$. Der Farbstoffgehalt betrug in beiden Lösungen $12,5 \mu\text{g/ml}$. Während Hyaluronsäure einen blauen Farbton annimmt, ist der Heparinansatz rötlich-violett (metachromatisch) gefärbt.

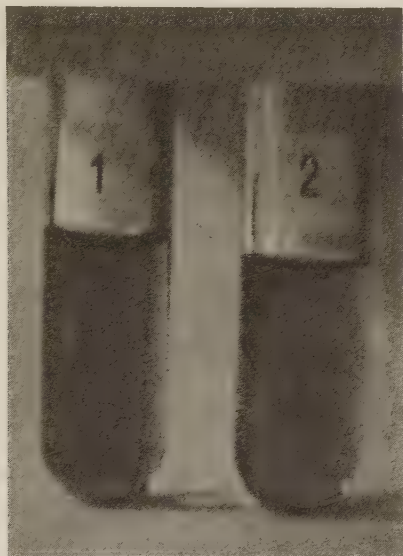


Abb. 10: Metachromotropie von Heparin (2) und Hyaluronsäure (1) in Konzentration von $50 \mu\text{g/ml}$ mit Toluidinblau ($12,5 \mu\text{g/ml}$)

Einfluß von Proteinlösungen auf die metachromatische Reaktion

4.3.1 Albumin

Eine metachromatischgefärbte Lösung ($25 \mu\text{g/ml}$ Heparin, $15 \mu\text{g/ml}$ Toluidinblau) zeigte nach Zugabe einer Albuminlösung von 1 mg/ml , daß die Kurve 2 in Abbildung 11 neben einem Absinken der metachromatischen γ -Bande bei $540 \text{ m}\mu$ einen deutlichen Anstieg der δ -Bande bei $640 \text{ m}\mu$ aufweist. Gleichzeitig wird die metachromatische Bande in den langwelligen Bereich verschoben. Das Absorptionsmaximum liegt bei $555 \text{ m}\mu$.

Eine Albuminkonzentration von 2,5 mg/ml für die gleiche Heparinlösung bewirkt ein weiteres Absinken der γ -Bande sowie eine Erhöhung der δ -Bande (Kurve 3, Abb.11). Die Lösungen behalten ihre metachromatische rötliche Farbe; der Blauanteil nimmt langsam zu.

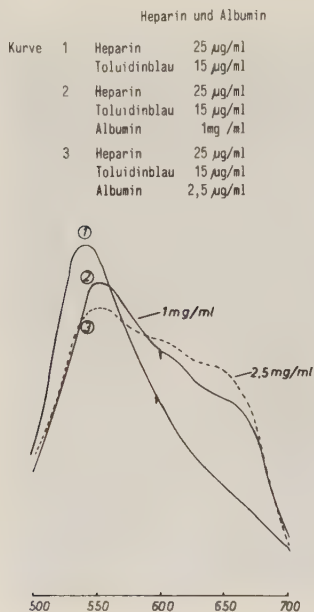


Abb. 11

Für eine Hyaluronsäurelösung mit 250 $\mu\text{g/ml}$ bei einer Toluidinblau-Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ vermag Albumin - bei einer Konzentration von 2,5 mg/ml - nicht, die violette Farbe der Lösung zu verändern.

Auch hier sinkt die γ -Bande ab, bei gleichzeitigem Anstieg der δ -Bande, jedoch ist diese Veränderung im Absorptionsspektrum geringfügig, sodaß die Farbe der Lösung bestehen bleibt (Abb.12).

Kurve 1	Hyaluronsäure	250 µg/ml
	Toluidinblau	15 µg/ml
Kurve 2	Hyaluronsäure	250 µg/ml
	Toluidinblau	15 µg/ml
	Albumin	2,5 mg/ml

Hyaluronsäure und Albumin



Abb. 12

Kurve 1	Hyaluronsäure	25 µg/ml
	Toluidinblau	15 µg/ml
Kurve 2	Hyaluronsäure	25 µg/ml
	Toluidinblau	15 µg/ml
	Albumin	2,5 mg/ml

Hyaluronsäure und Albumin

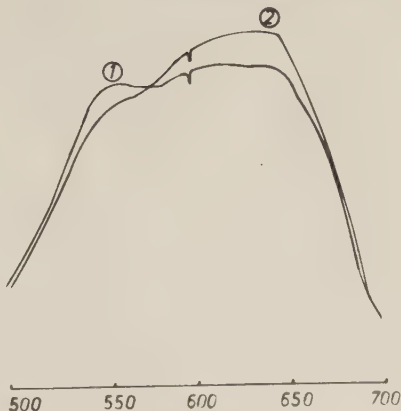


Abb. 13

Für die 10-fach verdünnte Hyaluronsäurelösung (25 µg/ml) - bei gleicher Farbstoffkonzentration - die noch eine violette Färbung aufweist, bewirkt Albumin - einer Konzentration von 2,5 mg/ml - einen Farbumschlag. Die Lösung erhält eine deutlich blaue Farbe. Die Ergebnisse dieses Versuches sind in Abbildung 13 veranschaulicht.

Albumin hat auf die metachromatische Reaktion von Heparin- und Hyaluronsäure-Lösungen einen geringen Einfluß. Die Reaktion ist für Heparin ausgeprägter als für Hyaluronsäure.

4.3.2 Lab-Trol

Die metachromatische Lösung aus Heparin und Toluidinblau (25 µg/ml Heparin, 12,5 µg/ml Toluidinblau) ergibt die in Abbildung 14, Kurve 1 dargestellte Absorptionskurve. Nach Zugabe von Lab-Trol-Lösungen verschiedener Konzentrationen (700 µg/ml, Kurve 2, 1,4 mg/ml, Kurve 3) erfolgt eine Abnahme des Absorptionsmaximums bei 540 mµ und ein Anstieg der α -Bande

als Zeichen eines zunehmenden Blauanteils der Lösung. Das Absorptionsmaximum wird in den Bereich von 550 $m\mu$ verschoben. Die Lösung behält jedoch ihren rötlichen Farbton.

Kurve 1	Heparin	25 $\mu g/ml$	gegen Aqua dest
	Toluidinblau	12,5 $\mu g/ml$	
2	Heparin	25 $\mu g/ml$	gegen Lab-Trol 700 $\mu g/ml$
	Toluidinblau	12,5 $\mu g/ml$	
	Lab-Trol	700 $\mu g/ml$	
3	Heparin	25 $\mu g/ml$	gegen Lab-Trol 1,4 mg/ml
	Toluidinblau	12,5 $\mu g/ml$	
	Lab-Trol	1,4 mg/ml	

Heparin und Lab-Trol

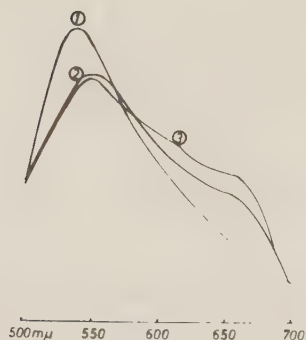


Abb. 14

Auf Lösungen aus Hyaluronsäure in einer Konzentration von 500 $\mu g/ml$ mit sehr deutlicher metachromatischer Farbe hat Lab-Trol keinen Einfluß.

Die 10-fach verdünnte Hyaluronsäure (50 $\mu g/ml$) hat nach Toluidinblaufärbung (12,5 $\mu g/ml$) einen starken Blauanteil. Dieser Blauanteil wird nach Zugabe von Lab-Trol-Lösung mit 700 $\mu g/ml$ noch erhöht, während die Abnahme der γ -Bande dazu vergleichsweise gering ist. (Abb. 15, Kurve 2)

Lab-Trol besitzt in den untersuchten Konzentrationen nur einen geringen hemmenden Einfluß auf das metachromatische Verhalten von Heparin und Hyaluronsäure. Diese Reaktion ist für Heparin aber deutlicher als für Hyaluronsäure.

Hyaluronsäure und Lab-Trol			
Kurve 1	Hyaluronsäure	50 $\mu\text{g/ml}$	
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	
2	Hyaluronsäure	50 $\mu\text{g/ml}$	
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	
	Lab - Trol	700 $\mu\text{g/ml}$	



Abb. 15

4.3.3 Gelatine

Gelatine in einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ zeigt für eine metachromatische Lösung von Heparin und Toluidinblau (25 $\mu\text{g/ml}$ Heparin, 12,5 $\mu\text{g/ml}$ Toluidinblau) den in Abbildung 16, Kurve 2 aufgezeichneten Effekt. In dieser Konzentration vermag Gelatine nicht den Farbton der Lösung zu verändern. Zwar nimmt die Intensität der Rotfärbung geringfügig ab, bei dem unbedeutenden Anstieg der λ -Bande ist eine Farbänderung jedoch nicht möglich.

Dieser Farbumschlag beginnt erst bei einer Gelatine-Konzentration von 500 $\mu\text{g/ml}$. (Abb. 16, Kurve 3)

Einen eindeutigen Farbumschlag bewirkt Gelatine in einer Konzentration von 5 mg/ml. Es ergibt sich die Kurve 4 in Abbildung 16.

Kurve 1	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
2	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
	Gelatine	50 $\mu\text{g/ml}$
3	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
	Gelatine	500 $\mu\text{g/ml}$
4	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
	Gelatine	5 mg/ml

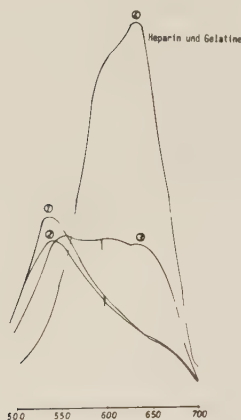


Abb. 16

Kurve 1	Hyaluronsäure	500 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
2	Hyaluronsäure	500 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
	Gelatine	50 $\mu\text{g/ml}$
3	Hyaluronsäure	500 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
	Gelatine	500 $\mu\text{g/ml}$
4	Hyaluronsäure	500 $\mu\text{g/ml}$
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$
	Gelatine	5 mg/ml

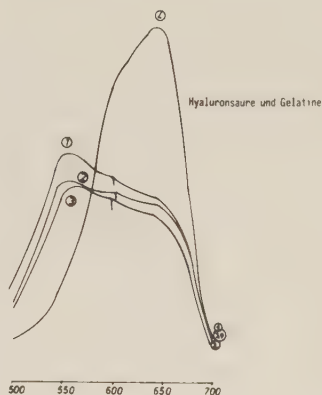


Abb. 17

Die Lösung von Hyaluronsäure und Toluidinblau (Hyaluronsäure 500 $\mu\text{g/ml}$, Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$) ergibt die Absorptionskurve 1 in Abbildung 17.

Nach Zugabe von Gelatine (50 $\mu\text{g/ml}$ = Kurve 2, 500 $\mu\text{g/ml}$ = Kurve 3, 5 mg/ml = Kurve 4) wird das Absorptionsspektrum verändert:

Bei niedriger Konzentration der Gelatine in der Lösung ist der Einfluß gering (Kurve 2). Das Absinken der Absorptionsbanden wird dabei durch die Bildung eines Precipitationsniederschlages erklärt, wobei der Lösung Farbstoffteile entzogen werden.

Beim Heraufsetzen der Gelatinekonzentration auf 500 $\mu\text{g/ml}$ beginnt die α -Bande zu steigen, während die γ -Bande erniedrigt wird. (Kurve 3)

Ist die Gelatinekonzentration auf 5 mg/ml in der Lösung gestiegen, hat diese eine blaue Farbe angenommen. Die Absorptionskurve weist einen hohen α -peak auf.

Gelatine vermag in hoher Konzentration von 5 mg/ml das metachromatische Verhalten von Heparin- und Hyaluron-

säure-Lösungen zu beeinflussen.

Es kommt schon bei niedrigen Gelatine-Konzentrationen zur Bildung eines Komplexes, der aus der Lösung ausfällt.

4.3.4 Myoglobin

Myoglobin ergibt aufgrund seiner gelbbraunen Eigenfarbe mit metachromatisch gefärbten Heparin- und Hyaluronsäure-Toluidinblau-Lösungen schwarzbraune Farblösungen. Für steigende Myoglobinkonzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$ und 2,5 mg/ml ergeben sich für Heparinlösungen von 25 $\mu\text{g/ml}$ bei einem Farbstoffanteil an Toluidinblau von 12,5 $\mu\text{g/ml}$ die Kurven 2, 3 und 4 der Abbildung 18.

Bei Verschiebung des Absorptionsmaximums der γ -Bande von 540 $\text{m}\mu$ in den langwelligeren Bereich von 550 $\text{m}\mu$ erfolgt eine konzentrationsabhängige Abnahme dieses Absorptionsmaximums. Gleichzeitig wird die α -Bande angehoben.

Wie die Kurve 4 der Abbildung 18 jedoch zeigt ist selbst für eine Konzentration von 2,5 mg/ml der Einfluß des Myoglobins für eine Farbänderung nicht ausreichend.

Heparin und Myoglobin

Kurve 1	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$	
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	gegen Aqua dest
2	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$	
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	gegen Myoglobinlosg.
	Myoglobin	250 $\mu\text{g/ml}$	mit 250 $\mu\text{g/ml}$
3	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$	
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	gegen Myoglobinlosg.
	Myoglobin	500 $\mu\text{g/ml}$	mit 500 $\mu\text{g/ml}$
4	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$	
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	gegen Myoglobinlosg.
	Myoglobin	2,5 mg/ml	mit 2,5 mg/ml

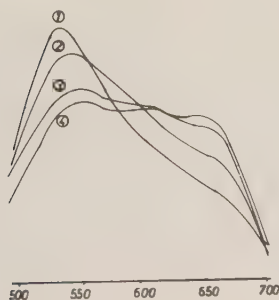


Abb. 18

Eine metachromatisch gefärbte Hyaluronsäure-Lösung (Hyaluronsäure 500 $\mu\text{g/ml}$, Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$) ließ dagegen eine stärkere Beeinflussung erkennen, wenn man Myoglobin in einer Konzentration von 2,5 mg/ml zufügte. Wie aus Abbildung 19 ersichtlich, wird die α -Bande so erhöht, daß sie bei gleichzeitigem Absinken der β -Bande diese in der Absorption übertrifft, was für die Lösung ein Überwiegen des Blauanteiles bedeutet, während Kurve 1 den Absorptionsverlauf einer violettgefärbten Lösung wiedergibt.

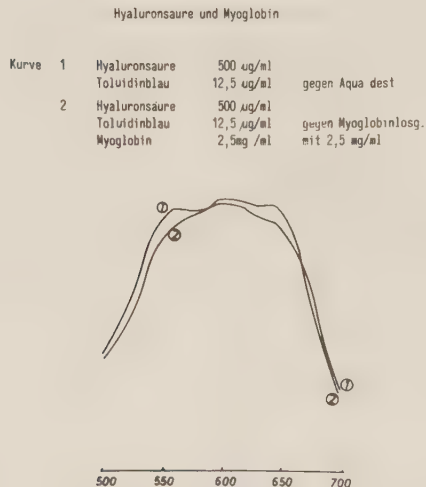


Abb. 19

Es läßt sich feststellen, daß Myoglobin nur einen geringen Einfluß auf Heparin- und Hyaluronsäure-Lösungen bezüglich ihres metachromatischen Verhaltens hat. Bei Anwesenheit von Myoglobin läßt die Absorptionskurve einen deutlich ausgeprägten β -peak erkennen.

4.3.5 Hämoglobin

Den Einfluß von Hämoglobin (25 $\mu\text{g/ml}$, 2,5 mg/ml) auf Heparinlösungen in der Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ zeigt Abbildung 20. Der Farbstoffgehalt an Toluidinblau beträgt 12,5 $\mu\text{g/ml}$.

Während Hämoglobin in einer Konzentration von 25 $\mu\text{g/ml}$ auf die metachromatische Reaktion von Heparin und Toluidinblau nur einen geringen Einfluß hat, ist die gleiche Lösung bei einer Hämoglobinkonzentration von 2,5 mg/ml völlig gehemmt. Auffallend am Verlauf der Absorptionskurve ist die deutliche Ausprägung der β -Bande.

Heparin und Hämoglobin				
Kurve 1	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$		
	Toluidinblau	125 $\mu\text{g/ml}$	gegen Aqua dest	
2	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$		
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	gegen Hämoglobinlös.	
	Hämoglobin	25 $\mu\text{g/ml}$	mit 25 $\mu\text{g/ml}$	
3	Heparin	25 $\mu\text{g/ml}$		
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	gegen Hämoglobinlös.	
	Hämoglobin	2,5 mg/ml	mit 2,5 mg/ml	

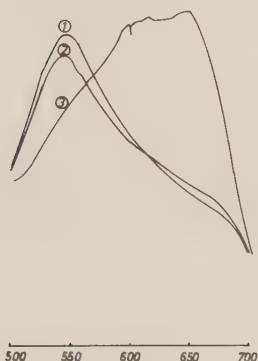


Abb. 20

Auch Hyaluronsäurelösungen, die mit Toluidinblau metachromatisch gefärbt sind (Hyaluronsäure 500 $\mu\text{g/ml}$, Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$), lassen sich in ihrem metachromatischen Verhalten erst von höheren Hämoglobinkonzentrationen beeinflussen.

Abbildung 21 zeigt den Einfluß einer Hämoglobinkonzentration von 2,5 mg/ml, der sich in einem starken Absinken der γ -Bande und einer deutlichen Anhebung der α - und β -Banden geltend macht. - Die β -Bande ist stark betont.

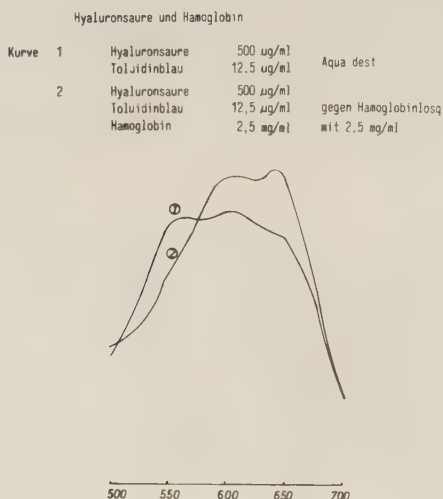


Abb. 21

Hämoglobin vermag in hoher Konzentration Heparin- und Hyaluronsäure-Lösungen in ihrer metachromatischen Anfärbbarkeit mit Toluidinblau zu beeinflussen.

4.3.6 α -Globulin

Den Einfluß von α -Globulin in den Konzentrationen von 250 $\mu\text{g/ml}$, 1250 $\mu\text{g/ml}$ und 5 mg/ml auf eine Heparin-Toluidinblaulösung (Heparin 25 $\mu\text{g/ml}$, Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$) zeigt Abbildung 22 in den Kurven 2, 3 und 4. Die Kurven 2 und 3 für niedere α -Globulin-Konzentrationen lassen ein geringfügiges Absinken der γ -Bande erkennen mit konzentrationsabhängiger Erhöhung des Absorptionsmaximums bei 640 $\text{m}\mu$ (α -Bande).

Bei hoher α -Globulin-Konzentration von 5 mg/ml hat die Lösung ihre rötliche Farbe verloren und ist blaugefärbt. Es fällt hierbei das deutliche Vortreten eines Absorptionsmaximums bei 610 m μ für die β -Bande auf.

Heparin und α -Globulin

Kurve	1	Heparin	25 ug/ml		
		Toluidinblau	12,5 ug/ml	gegen Aqua dest	
	2	Heparin	25 ug/ml		
		Toluidinblau	12,5 ug/ml	gegen α -Globulinlös.	
		α -Globulin	250 ug/ml	mit 250 ug/ml	
	3	Heparin	25 ug/ml		
		Toluidinblau	12,5 ug/ml	gegen α -Globulinlös.	
		α -Globulin	1250 ug/ml	mit 1250 ug/ml	
	4	Heparin	25 ug/ml		
		Toluidinblau	12,5 ug/ml	gegen α -Globulinlös.	
		α -Globulin	5 mg/ml	mit 5mg/ml	

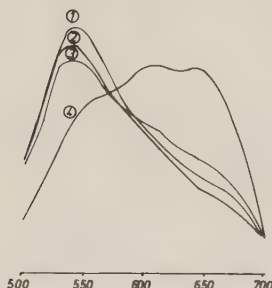


Abb. 22

Während α -Globulin in niedrigen Konzentrationen (250 μ g/ml, 1250 μ g/ml) auf eine Hyaluronsäurelösung, die mit Toluidinblau metachromatisch gefärbt ist (Hyaluronsäure 500 μ g/ml, Toluidinblau 12,5 μ g/ml) nur geringen Einfluß hat, zeigt die Abbildung 23 für α -Globulin in der Konzentration von 5 mg/ml eine deutliche Einflußnahme auf das metachromatische Verhalten (Kurve 3, Abb.23).

Die Lösung wird nach α -Globulin-Zugabe blau. Die β -Bande ist gut erkennbar.

Hyaluronsäure und α -Globulin

Kurve 1	Hyaluronsäure	500 $\mu\text{g/ml}$	gegen Aqua dest
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	
2	Hyaluronsäure	500 $\mu\text{g/ml}$	gegen α -Globulinlös. mit 5 mg/ml
	Toluidinblau	12,5 $\mu\text{g/ml}$	
	α -Globulin	50 mg/ml	

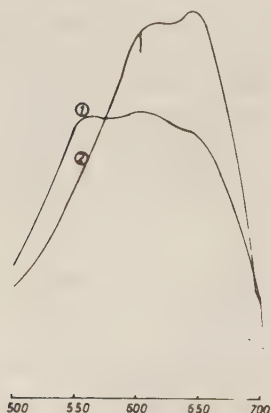


Abb. 23

4.3.7 Protaminsulfat

Protaminsulfat vermag bei niedriger Konzentration von 16,5 $\mu\text{g/ml}$ bei einer mit Toluidinblau angefärbten Heparinlösung (Heparin 16,5 $\mu\text{g/ml}$, Toluidinblau 10 $\mu\text{g/ml}$) die metachromatische Anfärbbarkeit zu unterdrücken. Die Lösung ist blau gefärbt, wie die Absorptionskurve 2 in Abbildung 24 erkennen läßt.

Erhöht man die Heparinkonzentration jedoch geringfügig auf 25 $\mu\text{g/ml}$ so wird die Metachromasie bei gleicher Farbstoffkonzentration nicht mehr verhindert, was Abbildung 25 Kurve 2 veranschaulicht. In dieser Konzentration vermag Protaminsulfat zwar das Absorptionsmaximum der - Bande bei 540 $\text{m}\mu$ herabzusetzen, die α -Bande bei 640 $\text{m}\mu$ dagegen zu erhöhen, jedoch ist die Einflußnahme soweit abgeschwächt, daß die Lösung wieder die metachromatische rötliche Farbe zeigt.

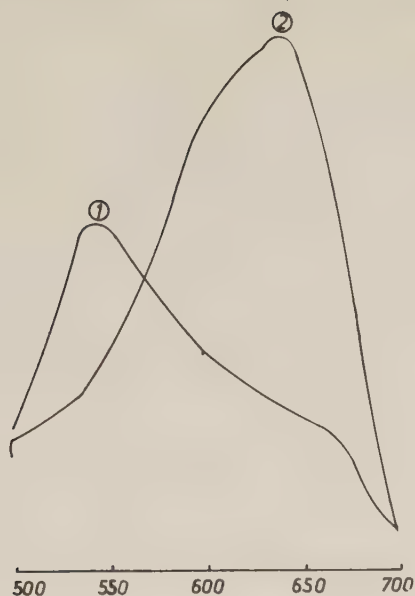


Abb. 24; Hemmung einer metachromatischen Lösung, Kurve 1, von Heparin ($16,5 \mu\text{g/ml}$) und Toluidinblau ($10 \mu\text{g/ml}$) durch Protaminsulfat, Kurve 2, in einer Konzentration von $16,5 \mu\text{g/ml}$

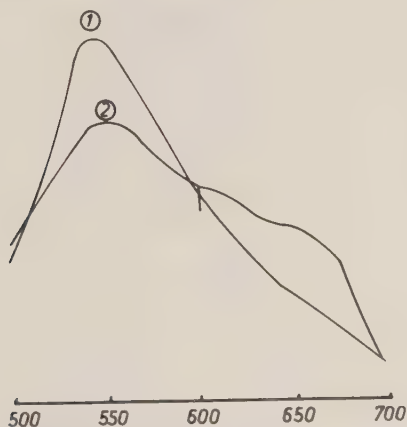


Abb. 25; Verminderter Einfluß, Kurve 2, von Protaminsulfat ($16,5 \mu\text{g/ml}$) auf die metachromatische Reaktion, Kurve 1, von Heparin ($25 \mu\text{g/ml}$) und Toluidinblau ($10 \mu\text{g/ml}$)

4.4.0 Einfluß von Enzymen auf die metachromatische Reaktion

4.4.1 Hyaluronidase

Um den Einfluß von Kinetin auf die Metachromotropie der Hyaluronsäure zu erfassen, wurde direkt nach Zugabe von Kinetin zu der Hyaluronsäure-Toluidinblau-Lösung (Hyaluronsäure 500 µg/ml, Toluidinblau 12,5 µg/ml) die Absorption gemessen. Es wurden 150 I.E. Kinetin dem Versuchsansatz zugefügt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 26, Kurve 2. Durch Inkubation der Hyaluronäurelösung mit Kinetin und Pufferlösung für 30 Minuten bei 37°C und anschließender Dialyse gegen Aqua dest. für 48 Stunden wurde die Enzymwirkung erfaßt.

Wie Abbildung 26 Kurve 2 zeigt, hat Kinetin als Eiweißkörper nur geringen Einfluß auf die metachromatische Reaktion. Nach erfolgter Enzymwirkung (Kurve 3) weist die metachromatisch gefärbte Hyaluronsäurelösung eine Farbänderung auf.

Kurve 1	Hyaluronsäure	500 µg/ml
	Toluidinblau	12,5 µg/ml
2	Hyaluronsäure	500 µg/ml
	Toluidinblau	12,5 µg/ml
	Kinetin	150 I.E.
3	(nach Inkubation und Dialyse)	
	2ml Pufferlösung (Phosphat-Citratpuffer pH = 4,1)	
	2ml Hyaluronsäure 2mg/ml	
	Kinetin 150 I.E.	
	30 Min. inkubiert bei 37°C	
	48 Std. dialysiert gegen Aqua dest	
	2ml Dialysat	
	+ 2ml Toluidinblau 25 µg/ml	

Hyaluronsäure - Abbau durch KINETIN

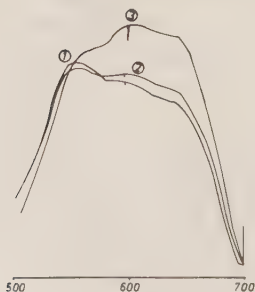


Abb. 26

Die Einflußnahme von Luronase auf das metachromatische Verhalten einer Hyaluronsäure-Toluidinblau-Lösung (Hyaluronsäure 500 µg/ml, Toluidinblau 12,5 µg/ml) wurde nach Zugabe von 150 I.E. Luronase durch Messung der Absorption direkt bestimmt. Das Ergebnis ist in Abbildung 27 Kurve 2 festgehalten.

Denach hat Luronase nur eine geringe Proteinwirkung auf die metachromatische Reaktion.

Nach Pufferzugabe, Inkubation und Dialyse wurde die enzymatische Wirkung der Luronase auf die Hyaluronsäurelösung festgestellt. Kurve 3 in Abbildung 27 zeigt den völligen Farbwechsel der Lösung in einem steilen Anstieg des α -peaks. Eine metachromatische Anfärbbarkeit der Hyaluronsäure nach Luronasewirkung ist nicht mehr vorhanden. Luronase vermag Hyaluronsäure stärker zu depolymerisieren als Kinetin.

Kurve 1	Hyaluronsäure	500 µg/ml
	Toluidinblau	12,5 µg/ml
2	Hyaluronsäure	500 µg/ml
	Toluidinblau	12,5 µg/ml
	Luronase	150 I.E.
3	nach Inkubation und Dialyse (mit Pufferzugabe)	

Hyaluronsäure - Abbau durch LURONASE

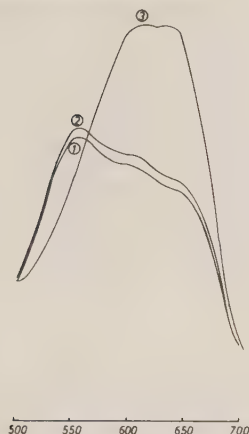


Abb. 27

Abbildung 28 zeigt den Einfluß von Thiomucase auf eine Hyaluronsäure-Toluidinblaulösung (Hyaluronsäure 500 µg/ml, Toluidinblau 12,5 µg/ml). Kurve 2 wurde direkt nach Zugabe von 150 T.E. = 150 I.E. aufgezeichnet.

Während sich die Eiweißwirkung von Kinetin und Luronase in den Versuchen als geringfügig erweist, vermag Thiomucase bereits aufgrund seiner Proteinwirkung die Lösung von violetter Farbe in Violettblau zu überführen.

Kurve 3 gibt das Ergebnis der Absorptionsmessung nach enzymatischem Abbau der Hyaluronsäure wieder. So erkennt man, daß Thiomucase von den 3 untersuchten Hyaluronidasen den ausgeprägtesten Einfluß auf die metachromatische Reaktion der Hyaluronsäure besitzt. Dies spricht für eine weitgehende Abnahme der Kettenlänge des Hyaluronsäuremoleküls.

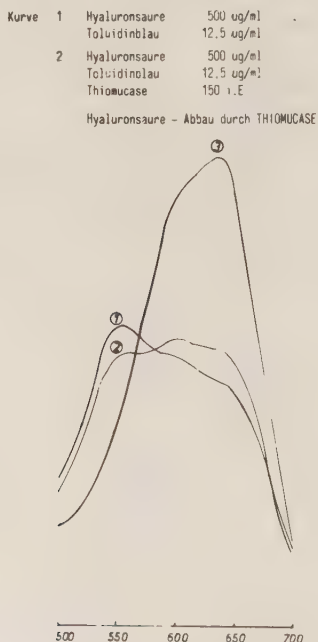


Abb. 28

Den Einfluß von Kinetin, Luronase und Thiomucase auf eine metachromatisch gefärbte Heparin-Toluidinblaulösung (Heparin 25 $\mu\text{g/ml}$, Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$) bei jeweils zugefügten 150 I.E. der Hyaluronsäure zeigt Abbildung 29.

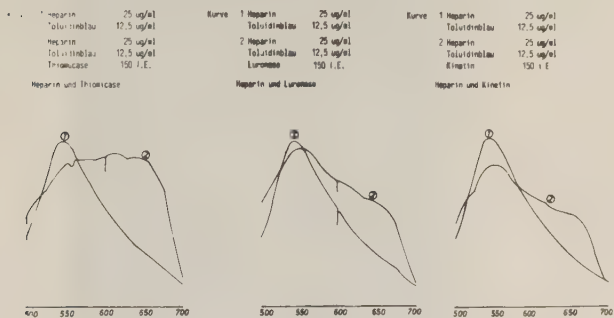


Abb. 29

Da es sich bei Heparin um ein Mucopolysaccharid handelt, das von den Enzymen nicht depolymerisiert werden kann, gibt der Verlauf der Absorptionskurven nach Enzymzugabe den reinen Proteineinfluß der Enzyme auf die metachromatische Reaktion des Heparins an.

Kinetin vermag dabei die γ -Bande stärker zu erniedrigen als Luronase. Eine Farbänderung der Versuchslösung wird aber nur von Thiomucase erreicht, da es pro 150 I.E. einen höheren Proteingehalt aufweist.

Diesen Farbumschlag zeigt Abbildung 30, in der Röhrchen 2 die metachromatisch gefärbte Heparinlösung enthält, während im Reagenzglas 3 dieselbe Lösung nach Zusatz von 150 I.E. Thiomucase enthalten ist.

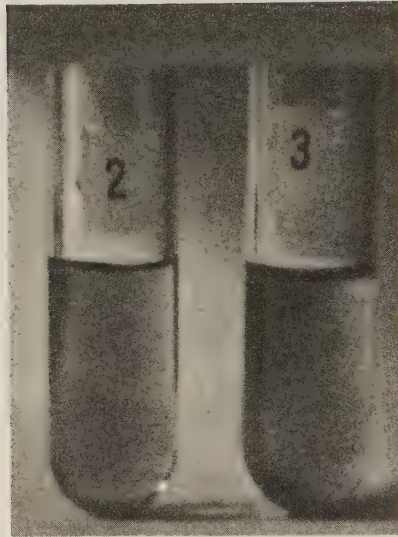


Abb. 30

4.4.2 Collagenase

Eine Heparin-Toluidinblau-Lösung (Heparin 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), die in ihrem metachromatischen Verhalten durch Gelatine in einer Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ beeinflusst war (Kurve 1 in Abbildung 31), wurde mit Collagenase in einer Konzentration von 75 E.U./ml in einer Kalziumacetatpuffer-Lösung, pH = 7,2, versetzt.

Nach Inkubation von 30 Minuten bei 37°C erfolgte eine Dialyse gegen Aqua dest. über 48 Stunden.

Abbildung 31 zeigt in Kurve 2 eine durch die Enzymwirkung der Collagenase bedingte Einflußminderung der Gelatine auf die metachromatische Reaktion. Die violettrote Farbe der Versuchslösung 1 wurde durch Collagenasewirkung in eine rötliche Farblösung umgewandelt.

Kurve 1 Hemmung einer Heparinlösung durch Gelatine
 Heparin 25 $\mu\text{g/ml}$
 Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$
 Gelatine 500 $\mu\text{g/ml}$
 2 ml Heparin 200 $\mu\text{g/ml}$
 1 ml Gelatine 4 $\mu\text{g/ml}$
 2 ml Kalziumacetatpuffer (pH=7,2) + 1 mg Collagenase (= 150 E / mg)
 30 Min. inkubiert
 48 Std. dialysiert

 2 ml Dialysat : [Heparin 25 $\mu\text{g/ml}$
 Gelatine 500 $\mu\text{g/ml}$
 2 ml Toluidinblau 25 $\mu\text{g/ml}$]

Gelatine Abbau durch Collagenase

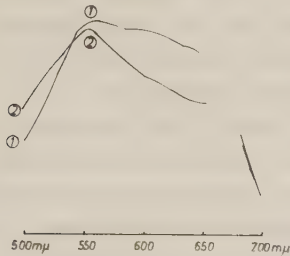


Abb. 31

Kurve 1 Heparin 25 $\mu\text{g/ml}$
 Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$
 2 Heparin 25 $\mu\text{g/ml}$
 Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$
 Collagenase 75 E.U./ml

Collagenase - Eiweißwirkung

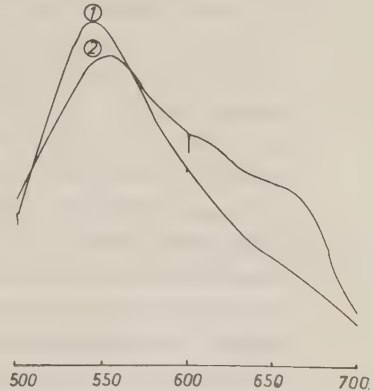


Abb. 32

Die Wirkung, die Collagenase in einer Konzentration von 75 E.U./ml als Protein auf eine Heparin-Toluidinblau-Lösung ausübt (Heparin 25 $\mu\text{g/ml}$, Toluidinblau 12,5 $\mu\text{g/ml}$) gibt Kurve 2 der Abbildung 32 wieder. Zwar wird nach Collagenasezusatz das Absorptionsmaximum der δ -Bande erniedrigt und in den langwelligen Bereich verschoben, die Erhöhung der α -Bande ist aber nicht ausreichend genug, um eine Farbänderung zu bewirken.

5.0.0 Diskussion

Es kann als gesichert angesehen werden, daß die Metachromasie von sauren Glycosaminoglycanen durch eine gerichtete Anlagerung von Farbstoffmolekülen an sulfatreiche, langkettige Mucopolysaccharide zustande kommt (21). Änderungen der Metachromotropie können sowohl durch Blockierung von Sulfatgruppen als auch durch Verkürzung der Kettenlänge der polyanionischen Heterosaccharide bedingt sein. Hinweise für diese Mechanismen lieferten histochemische und biochemische Untersuchungen an der menschlichen Aortenwand (14). So konnten PLATT u.a. zeigen, daß arteriosklerotisch veränderte Aortenbezirke - die histochemisch keine Metachromasie zeigten - einmal Aktivitätssteigerungen der am Abbau der Mucopolysaccharide beteiligten Enzyme aufweisen, zum anderen - mittels histochemischer Reaktionen - eine vermehrte Ablagerung Tyrosin- und Tryptophanhaltiger Eiweißkörper erkennen lassen.

In Übereinstimmung mit diesen, an Organen gewonnenen Ergebnissen stehen die in der vorliegenden Arbeit spektralphotometrisch erhobenen Befunde. Heparin, das unter den Glycosaminoglycanen aufgrund des hohen Sulfatierungsgrades die stärkste metachromatische Reaktion liefert, läßt - bei konstanter Farbstoffkonzentration - zwischen 50 µg/ml und 500 µg/ml keine wesentliche Steigerung der Metachromasie erkennen. Die stärkste metachromatische Reaktion zeigte die Lösung, in der das Verhältnis Heparin : Toluidinblau 5 : 1 betrug. Im Gegensatz dazu wies die Hyaluronsäure (frei von Sulfatgruppen) im höheren Konzentrationsbereich (500 µg/ml) mit zunehmender Farbstoffkonzentration die stärkste metachromotrope Reaktion auf.

Zur Frage der enzymatischen Beeinflussung der Metachromotropie von Heparin konnte keine Stellung genommen werden, da bisher keine Heparinase in gereinigter Form vorliegt. Die Untersuchungen zeigen jedoch, daß durch Zugabe von Proteinen - in Abhängigkeit von der Konzen-

tration - eine Abnahme der metachromatischen Reaktion eintritt.

Der enzymatische Einfluß von Hyaluronidase auf die Metachromotropie der Hyaluronsäure wird durch die Änderungen der Absorptionsbanden eindeutig aufgezeigt. Die Proteinkomponente des Enzyms geht, wie die Untersuchungen zeigen, nicht in die Reaktion ein.

Aus den Ergebnissen geht gleichzeitig hervor, daß je nach verwendetem Hyaluronidase-Präparat eine unterschiedlich starke Änderung der Metachromasie erfolgt.

Dieser Befund ist durch den unterschiedlichen Reinheitsgrad der Hyaluronidase-Präparate zu erklären.

Die Bedeutung der Molekülgröße der Proteinkomponente für die Metachromasie geht aus den Collagenase-Versuchen hervor. So nimmt nach Vorinkubation der Gelatine mit Collagenase die Beeinflussbarkeit der metachromatischen Reaktion ab.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen somit erkennen, daß die mittels histochemischer Reaktionen in Organen nachweisbaren Änderungen der Metachromotropie durch Proteine und Enzyme auch mit Hilfe spektralphotometrischer Messungen bei abgestuften Farbstoff- und Substratkonzentrationen erfaßt werden können.

6.0.0 Zusammenfassung

Die vorliegenden spektralphotometrischen Untersuchungen zeigen, daß die Metachromotropie saurer Glycosaminoglycane (= saure Mucopolysaccharide) - Heparin und Hyaluronsäure - durch Proteine und Enzyme beeinflusst werden kann. Als Proteine wurden Albumin, Lab-Trol, Gelatine, Myoglobulin, Hämoglobin, α -Globulin und Protaminsulfat als Enzyme Hyaluronidase (Kinetin, Luronase, Thiomucase) und Collagenase eingesetzt. Die stärkste metachromatische Reaktion zeigte Heparin. Durch Zugabe von Proteinen und Enzymen konnte eine Abnahme der metachromatischen Reaktion erzielt werden.

7.0.0 Literatur

1.) Ehrlich, P.

Beiträge zur Kenntnis der granulierten Bindegewebszellen und der eosinophilen Leukocyten.
Arch. Anat. Physiol.; Physiol. Abt. (1879), 166 - 169

2.) Scheibe, G.; Zanker, V.

Physikochemische Grundlagen der Metachromasie
Acta histochemica, Suppl. I, II (Jena 1958-61), 6 - 32

3.) Cornil, V.

Sur la dissocation du violet de méthylaniline et sa séparation en deux couleurs sous l'influence de certains tissus normaux et pathologiques, en particulier par les tissus en dégénérescence amyloïde.
C. rend. Acad. Sci. 80 (1875), 1288 - 1291

4.) Heschl,

Eine hübsche a vista-Reaktion auf amyloid degenerierte Gewebe
Wiener Mediz. Wochenschrift (1875), 25; 714 - 715

5.) Jürgens, R.

Eine neue Reaktion auf Amyloidkörper
Arch. f. path. Anat. u. Physiol. u. f. klin. Medizin (Virchow Archiv)

6.) Schubert, M.; Hamerman, D.

Metachromasia; Chemical Theory and Histochemical Use
Journ. Histochem. 4, (1956), 159

7.) Pappenheim, A.

Allgemeine Leukozytologie der Entzündung
Folia Haematol. 3, (1906), 564 - 569

8.) Michaelis, L.

Metachromasie
Enzyklopädie der Mikroskop. Techn. 3. Auflage, Bd. 2 (1926)
1376 - 1377
R. Krause; Urban & Schwarzenberg, Berlin

9.) Lison, L.

Etudes sur la metachromasie. Colorants metachromatiques et substances chromotropes
Arch. Biolog. 46 (1935); 599 - 668

- 10.) Missmahl, H. F.
Metachromasie durch gerichtete Zusammenlagerung von Farbstoffteilchen, erläutert am optischen Verhalten des Toluidinblau
Histochemie 3, (1964), 396 - 412
- 11.) Sylvén, B.
On the Interaction between Metachromatic Dyes and Various Substrates of Biological Interest
Acta histochemica, Suppl. I, II, (Jena 1958-61), 79 - 84
- 12.) Jorpes, J. E.
Konstitutionsformel des Heparinmoleküles
Biochem. J. 29, (1935), 1817
- 13.) Wolfrom, M.L., Montgomery, R., Karabinos, J.V., Rathgeb., P.
Metachromasia of Heparin
J.Americ.Chem.Soc. 72, (1950), 5796
- 14.) Platt, D., G.Beneke und E.Buddecke
Untersuchungen zur Vergleichbarkeit chemischer und histochemischer Befunde von arteriosklerotisch veränderten menschlichen Aorten
Klin. Wschr. 45 : 542 (1967)
- 15.) Platt, D. und H.-P. Luboeinski
The Activities of Glycosaminoglycan Hydrolases of Normal and Atherosclerotic Human Aorta
Angiologica 6 : 19 (1969)
- 16.) Buddecke, E.
Wechselwirkungen des Diffusionsfaktors Oligo - N-methylmorpholinium-propylenoxyd mit anionischen Polysacchariden
Hoppe-Seylers, Z.Physiol.Chem. : 330, 84 - 95 (1962)
- 17.) Buddecke, E. und R. Drzeniek
Stabilitätskonstanten der Calciumkomplexe von sauren Mucopolysacchariden
Hoppe-Seylers, Z.Physiol.Chem. : 327, 49 - 64 (1962)
- 18.) Weissman, B. and Meyer, K.
The structure of hyalobiuronic acid and of hyaluronic acid from umbilical cord.
J.Americ.Chem. Soc. 76 : 1753 - 1757 (1954)
- 19.) Levine, A. and Schubert, M.
Metachromasy of thiazine dyes produced by chondroitin-sulfat
J.Americ.Chem. Soc. 74 : 91 (1952)

20.) Wiame, J. M.

The metachromatic reaction of hexametaphosphate
J.Americ.Chem. Soc. 69 : 3146 - 3147 (1947)

21.) Lindner, J.

Eine einfache Methode zur Analyse von Gewebsschnitten
Naturwissenschaften 43 : 201 (1956)

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes darf ich an dieser Stelle Herrn Professor Dr. med. H. G. Lasch sehr herzlich danken.

Herrn Priv.Do. Dr. med. D. Platt gilt mein besonderer Dank für die Anregung zu der vorliegenden Arbeit und die freundliche Unterstützung bei allen auftretenden Fragen.



Lebenslauf

Ich, Klaus Haberkorn, wurde am 13. Nov. 1938 in Frankfurt am Main als Sohn des Industrie-Kaufmanns Heinrich Haberkorn und dessen Ehefrau Elisabeth, geb. Huck, geboren.

Als Folge des Krieges wurden meine Eltern 1940 nach Gelnhausen evakuiert, wo ich von 1945 - 1949 die Volksschule besuchte. 1950 verlegten meine Eltern ihren Wohnsitz nach Giessen/Lahn und ich absolvierte bis zum Abitur, Ostern 1959, das dortige Liebig-Gymnasium.

Vom Winter-Semester 1959/60 bis zum Sommer-Semester 1962 studierte ich an der Technischen Hochschule in Darmstadt Maschinenbau und legte 1962 die Diplom-Vorprüfung ab.

Nach einem aus persönlichen Gründen vollzogenen Studienwechsel belegte ich vom WS 1962/63 bis zum SS 1967 an der Philipps-Universität in Marburg a.d. Lahn das Fach Zahnheilkunde. Am 28.4.1965 bestand ich dort das Physikum und am 18.1.1968 legte ich mein Staatsexamen ab.

Nach Ablauf meiner Assistentenzeit praktiziere ich seit Juli 1970 in Würzburg als selbständiger Zahnarzt.

